



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SERTIFIKAT PATEN

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan Paten kepada:

Nama dan Alamat
Pemegang Paten

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG
Jl. Raya Tlogomas No. 246 Malang, Jawa Timur,
INDONESIA

Untuk Inovasi dengan
Judul

PROSES PEMBUATAN EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) SEBAGAI PENGHAMBAT PROSES INFLAMASI KONJUNGTIVA DAN KORNEA (INTERLEUKIN 1/IL1 DAN MATRIX METALLOPROTEINASE 9/MMP-9, DAN POLIMORFONUCLEAR/PMN) DAN PEMICU PROSES EPITELISASI KORNEA (EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR/EGFR)

Inventor

dr. Alfa Sylvestris, SpM

Tanggal Penerimaan

09 September 2013

Nomor Paten

IDP000043949

Tanggal Pemberian

23 Desember 2016

Perlindungan Paten untuk inovasi tersebut diberikan untuk selama 20 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 22 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari inovasi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



00-2017-114103

a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
REPUBLIK INDONESIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL
i.b.

Direktur Paten, Desain Tata Letak
Sirkuit Terpadu dan Rahasia Dagang,

Ir. Timbul Sinaga, M.Hum.
NIP. 196202021991031001

Malang, 30 MAY 2017

Keterangan :

Fotocopy ini, sesuai dengan aslinya

Sebagaimana tersimpan di Sentra HKI UMM

(12) PATEN INDONESIA

(11) IDP000043949 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 23 Desember 2016

(51) Klasifikasi IPC⁸ : A 61K 36/71

(1) No. Permohonan Paten : P00201300691

Tanggal Penerimaan: 09 September 2013

Data Prioritas :

(31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara

Tanggal Pengumuman: 05 Juni 2014

Dokumen Perbandingan:

1. Aprilita Rina: Uji Efek Immunostimulasi Ekstrak Air Biji Jintan
(*Nigella sativa* L.) Pada Mencit Putih (*Mus musculus* L.)
"Pengaruh Ekstrak Air Biji Jintan Bersih Karbon", Fakultas Farmasi UNTAG Jakarta,
Juni 2010.

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG
Jl. Raya Tlogomas No. 246 Malang, Jawa Timur,
INDONESIA

(72) Nama Inventor :
dr. Alfa Sylvestris, SpM, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :
Mohammad Isrok, SH.
622/2012
Sentra HKI UMM
Jl. Raya Tlogomas No 246 Malang, Lowokwaru,
Malang, Jawa Timur,
INDONESIA

Pemeriksa Paten : Dra. Ita Yukimartati, M.Si.

Jumlah Klaim : 3

PROSES PEMBUATAN EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) SEBAGAI PENGHAMBAT PROSES INFLAMASI
KONJUNGTIVA DAN KORNEA (INTERLEUKIN 1/IL1 DAN MATRIX METALLOPROTEINASE 9/MMP-9, DAN
POLIMORFONUKLEAR/PMN) DAN PEMICU PROSES EPITELISASI KORNEA (EPIDERMAL GROWTH FACTOR
RECEPTOR/EGFR)

Proses pembuatan ramuan terapi yang dipergunakan untuk menghambat proses inflamasi konjungtiva dan kornea
matrix metalloproteinase 9 / MMP-9, dan polimorfonuklear / PMN) dan pemicu proses epitelisasi kornea (Epidermal
growth factor receptor / EGFR

Ekstrak biji jintan hitam (*N. Sativa*) dengan pelarut etanol secara maserasi menggunakan perbandingan 50 g bubuk jintan
hitam dengan 500 ml etanol 95% sampai terjadi homogenasi, selanjutnya menyimpan larutan dalam refrigerator bersuhu 40°C semalam, lalu
dikeringkan dengan pelarutnya menggunakan *Rotary Evaporator* pada suhu 35°C hingga menjadi larutan pekat, kemudian
dikeringkan sebanyak 1000 mg dengan 1 ml DMSO, selanjutnya mengencerkan hingga 1 mg/ml.

Ekstrak biji jintan hitam (*N. Sativa*) bermanfaat untuk menurunkan faktor-faktor inflamasi IL-1, MMP-9, PMN dan meningkatkan EGFR
pada kornea penderita menopause.

Pembuatan ekstrak jintan hitam (*N. Sativa*) dengan dosis minimal 2,5 mg/kg BB per hari, hingga 10 mg/kg BB/hari selama 10 hari
selama 1 bulan pada model menopause.

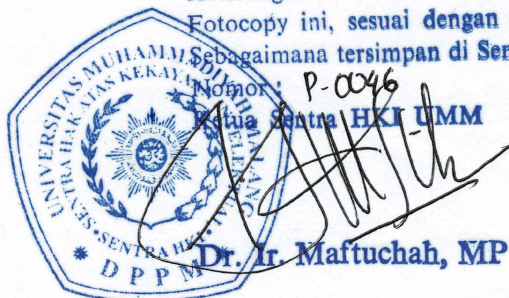
30 MAY 2017

Malang,

Keterangan :

Fotocopy ini, sesuai dengan aslinya
Sebagaimana tersimpan di Sentra HKI UMM

Nomor : P-0046
Ketua Sentra HKI UMM





DESKRIPSI

PROSES PEMBUATAN EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) SEBAGAI
PENGHAMBAT PROSES INFLAMASI KONJUNGTTIVA DAN KORNEA (INTERLEUKIN
1 / IL1, MATRIX MATALLOPROTEINASE 9 / MMP-9, DAN
5 POLIMORFONUCLEAR / PMN) DAN PEMICU PROSES EPITELISASI KORNEA
(EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR / EGFR)

Bidang Teknik Invensi

Invensi berkaitan dengan proses pembuatan ekstrak
10 jintan hitam (*Nigella sativa*) mulai dari bahan dan teknik
pembuatan sebagai satu kesatuan dengan fungsinya sebagai
ramuan terapi yang dipergunakan untuk menghambat proses
inflamasi konjungtiva dan kornea (interleukin 1 / IL-1,
matrix matalloproteinase 9 / MMP-9, polymorfonuclear / PMN)
15 dan proses epitelisasi kornea (Epidermal Growth Factor
Receptor / EGFR).

Latar Belakang Invensi

Kondisi status kesehatan manusia di dunia pada tahun
2012 semakin meningkat, sehingga secara tidak langsung akan
20 meningkatkan angka harapan hidup. Dengan semakin
meningkatnya angka harapan hidup ini maka jumlah wanita
yang mengalami menopause akan semakin meningkat. Sehingga
gangguan yang berhubungan dengan kondisi menopause (terjadi
penurunan kadar estrogen) akan semakin meningkat.

25 Berbagai kelainan yang terjadi pada wanita menopause
mendorong para peneliti mencoba mencari berbagai terapi
untuk mencari sumber estrogen dari luar tubuh (estrogen
eksogen) sebagai pengganti estrogen endogen yang relatif
aman. Beberapa senyawa yang berasal dari tumbuh-tumbuhan
30 diketahui mempunyai sifat estrogenik. Senyawa tersebut

10



adalah flavon, isoflavon dan derivat koumestan. (Tanu 2005).

Jintan hitam (*N. sativa*) adalah rempah-rempah yang dapat digunakan sebagai tanaman obat dan pengawet makanan. 5 Tanaman ini adalah tanaman herba yang banyak tumbuh di daerah Mediterania. Baik minyak maupun biji jintan hitam (*N. sativa*) menunjukkan potensi sebagai bahan pengobatan dalam obat-obatan tradisional (Randhawa, 2008).

Jintan hitam (*N. sativa*) memiliki senyawa flavonoid 10 dan tanaman yang satu rumpun dengan *N. sativa* yaitu *N. damascene* diketahui memiliki efek estrogenik yang tinggi (Malhotra, 2004). Jintan hitam (*N. sativa*) memiliki banyak efek. Efek jintan hitam (*N. sativa*) yang telah diteliti meliputi efek antioksidan, anti diabetik, anti kanker, 15 antimikroba, gastroprotektif, efek pada sistem syaraf pusat, dan efek anti inflamasi. Saat ini penelitian mengenai efek anti inflamasi di mata masih belum mendapat banyak perhatian (Ilaiyaraaja, 2010).

Dikenal dengan berbagai nama, di antaranya black seed, 20 black caraway, natura seed, jintan hitam (bahasa Indonesia), black cumin, *Nigella sativa*, kaludru, Al Habba Al Sauda atau Al Habba Al Barokah dalam bahasa Arab, dan lain-lain (Randhawa, 2008). Digunakan sebagai herbal pengobatan sejak 2000-3000 tahun sebelum Masehi dan 25 tercatat dalam banyak literatur kuno mengenai ahli pengobatan terdahulu seperti Ibnu Sina (980 - 1037 M), dan Al-Biruni (973-1048 M), Al-Antiki, Ibnu Qayyim dan Al-Baghdadi. Ibnu Sina adalah peneliti jenius dari Timur Tengah di bidang pengobatan yang namanya tercatat di semua 30 buku sejarah pengobatan timur maupun barat, hidup antara 980 - 1037 M, telah meneliti berbagai manfaat Habbatussauda



untuk kesehatan dan pengobatan. Ahli pengobatan Yunani kuno, Dioscoredes, pada abad pertama Masehi juga telah mencatat manfaat habbatussauda untuk mengobati sakit kepala dan saluran pernafasan (Randhawa,2008).

- 5 Senyawa aktif yang terkandung didalam jintan hitam (*N. sativa*) diantaranya adalah nigellisine, nigellidine, nigellimine-N-oksida, thymoquinone, dithymoquinone, thymohydroquinon, nigellone, thymol, arvacrol, oxy-coumarin, 6-methoxycoumarin, dan 7-hydroxy-coumarin, alpha-
- 10 hedrin, steryl-glucoside, selain itu juga mengandung flavinoids, tannins, asam amino esensial, asam askorbat, besi dan kalsium (Randhawa 2008).

Selain itu berdasarkan analisis farmakologi diketahui bahwa ekstrak biji jintan hitam (*N. sativa*) memiliki

15 aktivitas yang sangat beragam diantaranya adalah sebagai stimulan peningkat imunitas tubuh, stimulan anti-diabetes, anti-hipertensi, anti inflamasi, aktivitas antimikroba, dan antitumor. Mayoritas aktivitas tersebut disebabkan karena kandungan quinone yang ada di dalam biji tersebut (Mbarek

20 et al., 2007). Menurut Sharma et al. (2009) biji jintan hitam (*N. sativa*) merangsang pembentukan sumsum tulang dan sel sel antibodi, melindungi tubuh terhadap berbagai virus, menghancurkan sel tumor dan menghambat terjadinya infeksi.

Individu yang mengalami penurunan kadar estrogen (masa

25 menopause) memiliki resiko mengalami inflamasi pada konjungtiva dan korneanya, berkaitan dengan keberadaan reseptor estrogen dan androgen pada kelenjar lakrimal dan meibomian mata. Keadaan tersebut akan menimbulkan dry eye syndrome (DES) atau sindroma mata kering (SMK) (Foster,

30 2012).

(EGF) merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap terjadinya interaksi seluler dalam proses epitelisasi kornea. EGF didapatkan pada berbagai jaringan dan identifikasinya dapat dilakukan melalui pengenalan reseptor
5 EGF (EGFR atau erbB) yang terdapat pada permukaan sel. (Zhou, 2002).

Dosis yang tepat untuk manusia diestimasi dari komponen aktifnya (thymoquinon = TQ)) dan berdasarkan hasil penelitian pada tikus untuk mencari dosis efektif.
10 Dengan menggunakan NOEL (No observed adverse effect level) dan HED (human equivalent dose) diperoleh dosis TQ 0,6 mg/kg/hari peroral. Pada percobaan tikus dengan rematoid artritis diperoleh dosis TQ 2.5 - 5 mg/kg/hr (Valizadeh, 2009). Pada pengobatan tradisional Indian 10-20 gram biji
15 Nigella akan memperbaiki keadaan dismenore dan pada dosis yang lebih besar dapat menginduksi abortus (Malhotra, 2004).

Apapun penyebab awal SMK, kekeringan kronis yang terjadi pada permukaan bola mata menyebabkan reaksi
20 inflamasi dan kerusakan bertahap dari kelenjar lakrimalis, epitel konjungtiva, dan epitel kornea. Inflamasi merupakan mekanisme kunci pada kelainan permukaan bola mata, baik sebagai penyebab maupun akibat dari kerusakan sel yang terjadi. Kerusakan epitel permukaan bola mata sedikit saja
25 cukup untuk menimbulkan SMK yang signifikan. SMK berhubungan dengan berbagai derajat inflamasi permukaan bola mata yang bermanifestasi sebagai mata merah. Hal pertama yang menyebabkan terjadinya inflamasi adalah adanya stimulus, yang menginduksi munculnya ekspresi sitokin
30 proinflamasi dan berbagai mediator lainnya, yang secara keseluruhan merupakan sinyal bagi tubuh bahwa telah terjadi

5

10

30

Peningkatan ekspresi penanda aktivasi imun pada epitel konjungtiva, yaitu HLA-DR, intercellular adhesion molecule (ICAM-1), dan CD-40.

Pemberian terapi antiinflamasi dapat memperbaiki
5 gejala dan tanda SMK. Meningkatnya sel-sel inflamasi dan konsentrasi sitokin proinflamasi pada permukaan bola mata dan air mata pada SMK berhubungan dengan meningkatnya ekspresi faktor-faktor proapoptotik pada epitel konjungtiva (Fas, Fas ligand, APO 2,7, CD 40, CD 40
10 ligand) (Yeh, 2003).

Meskipun jalur apoptosis yang terjadi pada SMK belum jelas, namun fenomena ini memegang peranan penting dalam patogenesis dan manifestasi klinis SMK. Terdeteksinya caspase 3 yang teraktivasi dan fragmen PARP p85 pada epitel
15 konjungtiva bulbar dan tarsal serta pada epitel kornea sentral dan perifer hewan coba tikus model mata kering, menunjukkan bahwa mediator apoptosis ini mungkin terlibat dalam pathogenesis SMK. Sitokin proinflamasi yang terbentuk pada permukaan bola mata penderita SMK akan mengaktivasi
20 jalur ekstrinsik apoptosis. Kematian sel yang bertanggung jawab pada proteksi permukaan bola mata, misalnya sel goblet konjungtiva, akan menyebabkan progresivitas SMK berlanjut (Yeh, 2003).

Paten terkait dengan *nigella sativa* " Inhibitors of
25 extracellular proteases (EP 1370272 A1/ WO2002069992A1, 2003)" : Penemuan ini memberikan ekstrak tumbuhan yang diturunkan terdiri dari aktivitas penghambatan terhadap satu atau lebih protease ekstraseluler yang menurunkan matriks jaringan manusia. Selain itu, jumlah aktivitas
30 penghambatan dalam ekstrak dapat ditingkatkan dengan menekankan tanaman sebelum membentuk ekstrak. Ekstrak

masing-masing dibuat dengan proses standar dan menunjukkan kemampuan untuk menghambat satu atau lebih protease ekstraseluler yang menurunkan matriks jaringan manusia. Perpustakaan ekstrak dapat dibuat dari tanaman stres dan non-stres, dimana masing-masing ekstrak menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap satu atau lebih inhibitor protease ekstraseluler. Atau, semi-dimurnikan dan dimurnikan senyawa penghambat dapat diisolasi dari ekstrak mengikuti prosedur standar. Dalam satu aspek, ekstrak dengan aktivitas inhibisi dapat digunakan selama pemurnian protein untuk meminimalkan degradasi karena protease ekstraseluler.

Ekstrak tanaman untuk pengobatan angiogenesis dan metastasis (EP 1539204 A1/ WO2004019961A1, 2005): Ekstrak dari bahan tanaman, atau molekul senyawa semi-purified/purified atau dibuat dari ekstrak yang menunjukkan kemampuan untuk memodulasi satu atau lebih kegiatan selular disediakan. Ekstrak mampu memperlambat, menghambat atau mencegah migrasi sel, misalnya, migrasi sel endotel atau sel neoplastik dan dengan demikian, penggunaan ekstrak untuk memperlambat, menghambat atau mencegah migrasi sel abnormal pada hewan juga disediakan. Metode pemilihan dan penyiapan ekstrak tumbuh-tumbuhan dan metode skrining ekstrak untuk menentukan kemampuan mereka untuk memodulasi satu atau lebih aktivitas seluler dijelaskan. Pemurnian atau semi-pemurnian satu atau lebih molekul dari ekstrak dijelaskan juga dimaksudkan serta penggunaan molekul, sendiri atau dalam kombinasi dengan ekstrak, untuk memperlambat, menghambat atau mencegah migrasi sel abnormal pada hewan.

Methods and therapeutic compositions comprising plant extracts for the treatment of cancer (EP 1816996 A1 / WO2006039807A1): Sebuah metode untuk mengobati kanker dengan menargetkan dua protease, MMP-9 dan cathepsin B disediakan. Terapi komposisi yang terdiri dari ekstrak tumbuh-tumbuhan satu atau lebih yang menghambat MMP-9 dan / atau cathepsin B, yang mampu menghambat migrasi sel neoplastik dan / atau endotel, pertumbuhan tumor, tumor-induced angiogenesis dan / atau metastasis juga disediakan. Komposisi terapi penemuan ini dapat digunakan dalam pengobatan kanker, dan, metode menghambat pertumbuhan tumor, metastasis tumor, dan / atau tumor-angiogenesis diinduksi menggunakan komposisi terapi sendiri atau dalam kombinasi dengan agen anti kanker, oleh karena itu, juga disediakan.

Methods and therapeutic compositions comprising plant extracts for the treatment of cancer (EP 1816996 A1 / WO2006039807A1): Sebuah metode untuk mengobati kanker dengan menargetkan dua protease, MMP-9 dan cathepsin B disediakan. Terapi komposisi yang terdiri dari ekstrak tumbuh-tumbuhan satu atau lebih yang menghambat MMP-9 dan / atau cathepsin B, yang mampu menghambat migrasi sel neoplastik dan / atau endotel, pertumbuhan tumor, tumor-induced angiogenesis dan / atau metastasis juga disediakan. Komposisi terapi penemuan ini dapat digunakan dalam pengobatan kanker, dan, metode menghambat pertumbuhan tumor, metastasis tumor, dan / atau tumor-angiogenesis diinduksi menggunakan komposisi terapi sendiri atau dalam kombinasi dengan agen anti kanker, oleh karena itu, juga disediakan.



Inhibitors of extracellular proteases, (EP 1370272 A1/
WO2002069992A1): Penemuan ini memberikan ekstrak tumbuhan
yang diturunkan terdiri dari aktivitas penghambatan
terhadap satu atau lebih protease ekstraseluler yang
5 menurunkan matriks jaringan manusia. Selain itu, jumlah
aktivitas penghambatan dalam ekstrak dapat ditingkatkan
dengan menekan tanaman sebelum membentuk ekstrak.
Ekstrak masing-masing dibuat dengan proses standar dan
menunjukkan kemampuan untuk menghambat satu atau lebih
10 protease ekstraseluler yang menurunkan matriks jaringan
manusia. Perpustakaan ekstrak dapat dibuat dari tanaman
stres dan non-stres, dimana masing-masing ekstrak
menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap satu atau lebih
inhibitor protease ekstraseluler. Atau, semi-dimurnikan dan
15 dimurnikan senyawa penghambat dapat diisolasi dari ekstrak
mengikuti prosedur standar. Dalam satu aspek, ekstrak
dengan aktivitas inhibisi dapat digunakan selama pemurnian
protein untuk meminimalkan degradasi karena protease
ekstraseluler.

20 Prosedur pembuatan ekstrak jintan hitam (*N. sativa*)
mengacu pada metode yang dilakukan oleh Farah (2005)
menggunakan pelarut etanol 95% (Farah, 2005). Modifikasi
yang dilakukan dari prosedur tersebut adalah penggunaan
rotary evaporator dengan suhu 35°C untuk memisahkan ekstrak
25 dengan pelarutnya dengan lebih cepat dibandingkan secara
manual.

Uraian Singkat Invensi

Pembuatan ekstrak bubuk biji *Nigella sativa* merupakan
30 modifikasi metode Farah (2005). Bubuk *Nigella sativa*

5
10

15
20
25

30

terkecil yang dapat menyebabkan penurunan ekspresi MMP 9 epitel kornea adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) yang diberikan maka penurunan ekspresi MMP 9 semakin bermakna. Invensi ini dapat menurunkan inflamasi epitel kornea yang ditandai dengan menurunnya ekspresi MMP 9. Penurunan MMP 9 ini menunjukkan berkurangnya degradasi matrix metalloproteinase dalam arti berkurangnya kerusakan yang terjadi pada permukaan bola mata penderita SMK.

10

Hasil analisa menunjukkan bahwa terdapat peningkatan bermakna dari invensi ini terhadap ekspresi MMP 9 epitel kornea. Pada analisa lanjutan didapatkan peningkatan ekspresi MMP 9 yang menyerupai bahkan melebihi kondisi normal. Dosis jintan hitam (*N. sativa*) terkecil yang dapat menyebabkan peningkatan ekspresi EGFR epitel kornea adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) yang diberikan maka peningkatan ekspresi EGFR semakin bermakna.

20

Hasil uji pemberian invensi ini terhadap ekspresi EGFR sebagai salah satu parameter faktor reepitelisasi telah sesuai dengan hipotesa penelitian. yaitu terdapat pengaruh yang signifikan antara pemberian ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) dengan peningkatan reepitelisasi epitel kornea yang ditandai dengan peningkatan ekspresi EGFR. Peningkatan EGFR ini menunjukkan perbaikan reepitelisasi pada permukaan bola mata penderita SMK.

30

Hasil analisa menunjukkan bahwa terdapat penurunan bermakna dari ekstrak invensi ini terhadap ekspresi PMN epitel konjungtiva dan kornea penderita menopause. Pada

analisa lanjutan didapatkan penurunan ekspresi PMN yang menyerupai kondisi normal. Dosis jintan hitam (*N. sativa*) terkecil yang dapat menyebabkan penurunan ekspresi PMN epitel konjungtiva dan kornea adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) yang diberikan maka penurunan ekspresi EGFR semakin bermakna.

Hasil pengujian pemberian invensi ini terhadap ekspresi PMN sebagai salah satu parameter faktor inflamasi telah terbukti dapat menurunkan inflamasi epitel konjungtiva dan kornea yang ditandai dengan penurunan ekspresi PMN. Penurunan ekspresi PMN ini menunjukkan perbaikan kondisi inflamasi di permukaan bola mata penderita SMK.

15

Sediaan 1 mg/ml jintan hitam (*N. sativa*) untuk dosis 2,5, 5, dan 10 mg/kg BB/hari. Sehingga dengan berat tikus rata-rata 185 gram dibutuhkan untuk: Dosis 2,5 mg/kg BB/hari = $0,185 \times 2,5 = 0,4625$ mg/ hari = 0,46 cc/hari. Dosis 5 mg/kg BB/hari = $0,185 \times 5 = 0,925$ mg/ hari = 0,93 cc/hari. Dosis 10 mg/kg BB/hari = $0,185 \times 10 = 1,85$ mg/ hari = 1,85 cc/hari

Uraian Lengkap Invensi

Secara epidemiologis angka kejadian Sindroma Mata Kering meningkat setelah menopause sehingga diduga hormon seks steroid memegang peranan penting dalam patogenesis terjadinya SMK. Penanan estrogen sebagai salah satu hormon seks steroid terhadap terjadinya SMK cukup penting, karena ditemukannya reseptor estrogen pada konjungtiva dan kornea hewan coba serta manusia. Pada penelitian ini digunakan

30

hewan coba tikus, dimana telah terbukti pada penelitian sebelumnya oleh Tachibana et al bahwa pada konjungtiva dan kornea tikus didapatkan reseptor estrogen Alpha dan Beta (Tachibana M, 2000).

5 Pemberian invensi ini dapat menurunkan inflamasi (IL-1) konjungtiva dan kornea

Teori yang berkembang selama ini, bahwa pada kondisi menopause, baik secara alami ataupun operatif, akan terjadi peningkatan spontan dari ekspresi dan konsentrasi sitokin-
10 sitokin proinflamasi, termasuk IL 1. Ekspresi sitokin IL 1 tampak menurun setelah pemberian ekstrak jintan hitam (*N. sativa*).

Hasil analisa menunjukkan bahwa terdapat penurunan bermakna dari ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) terhadap
15 ekspresi IL-1 konjungtiva tikus yang di ovariektomi ($p < 0,05$). Pada analisa lanjutan didapatkan penurunan ekspresi IL 1 yang menyerupai kondisi normal. Dosis jintan hitam (*N. sativa*) terkecil yang dapat menyebabkan penurunan ekspresi IL 1 konjungtiva adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin tinggi dosis
20 ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) yang diberikan maka penurunan ekspresi sitokin IL 1 semakin bermakna.

Peningkatan sitokin proinflamasi terbukti meningkatkan jumlah ER β dibanding ER α , terutama pada kondisi inflamasi kronis. Bila hal ini terjadi, maka
25 pemberian ekstrak Jintan hitam (*N. sativa*) yang afinitas ikatannya lebih besar pada ER β dibandingkan ER α sangat membantu untuk menurunkan ekspresi IL 1 karena ikatan yang terjadi antara ER β dengan ligandnya bersifat menghambat transkripsi. Pengaruh Jintan hitam (*N. sativa*) terhadap
30 ekspresi IL 1 tergantung jenis sel, kondisi lingkungan, dan konsentrasi jintan hitam (*N. sativa*) yang diberikan.

Terdapat faktor-faktor lain di dalam jenis sel yang berbeda, yang menyebabkan terjadinya efek yang spesifik pada sel yang berbeda. Invensi ini menunjukkan ekspresi IL 1 yang menurun pada pemberian jintan hitam (*N. sativa*)
5 dosis 2,5 mg/kgBB, 5 mg/ kgBB, dan 10 mg/kgBB terjadi karena ikatan antara jintan hitam (*N. sativa*) dengan ER akan menghambat aktivasi promotor gen IL 1, sehingga protein inflamasi yang diinduksi IL 1 pada konjungtiva juga akan menurun. Dosis jintan hitam (*N. sativa*) yang diduga
10 dapat menyebabkan penurunan IL 1 konjungtiva hingga sama dengan kondisi kontrol negatif adalah 10 mg/kgBB.

Pemberian invensi ini dapat menurunkan inflamasi konjungtiva yang ditandai dengan menurunnya ekspresi sitokin proinflamasi IL 1. Penurunan proses inflamasi pada
15 konjungtiva ini pada akhirnya akan memperbaiki kerusakan pada permukaan bola mata penderita SMK.

Pemberian ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) menurunkan ekspresi MMP 9 epitel konjungtiva dan kornea

20 Sejalan dengan teori yang berkembang selama ini, bahwa pada kondisi menopause, baik secara alami ataupun operatif, akan terjadi peningkatan spontan dari ekspresi dan konsentrasi sitokin-sitokin proinflamasi, yang memacu pengaktifasian jalur MAPK sebagai regulator utama
25 transkripsi MMP. Ekspresi MMP 9 tampak menurun setelah pemberian ekstrak jintan hitam (*N. sativa*).

Pemberian invensi ini menunjukkan bahwa terdapat penurunan bermakna dari ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) terhadap ekspresi MMP 9 epitel kornea. Pada analisa
30 lanjutan didapatkan penurunan ekspresi MMP 9 yang menyerupai kondisi normal. Dosis jintan hitam (*N. sativa*)

terkecil yang dapat menyebabkan penurunan ekspresi MMP 9 epitel kornea adalah 2,5 mg/kg BB. Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) yang diberikan maka penurunan ekspresi MMP 9 semakin bermakna.

- 5 Metaloproteinase matriks (MMPs) bertanggung jawab untuk degradasi matriks ekstraseluler dan memainkan peran penting dalam migrasi sel, proliferasi, dan remodeling jaringan yang terkait dengan proses inflamasi. Interleukin-1beta (IL-1beta) menginduksi MMP-9 produksi di banyak tipe
- 10 sel dan berkontribusi terhadap respon inflamasi. Mekanisme yang mendasari induksi MMPs oleh sitokin IL 1 β (HTSMCs) hingga saat ini masih menjadi perdebatan para ahli. Diduga terdapat peran p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, dan NF-kappaB jalur untuk IL-1beta-induced-9 MMP produksi HTSMCs. IL-
- 15 1beta diinduksi produksi MMP-9 protein dan mRNA dalam waktu-dan cara tergantung konsentrasi ditentukan oleh zymographic, Western blotting, dan RT-PCR analisis, yang dilemahkan oleh inhibitor dari MEK1 / 2 (U0126), p38 MAPK (SB202190), JNK (SP600125), dan NF-kappaB (helenalin), dan
- 20 transfeksi dengan mutan negatif dominan MEK1 / 2, p38 dan JNK, masing-masing. IL-1beta-dirangsang fosforilasi p42/p44 MAPK, p38 MAPK, dan JNK adalah dilemahkan oleh pretreatment dengan U0126,, SB202190 SP600125, atau transfeksi dengan mutan negatif dominan MEK, ERK, p38 dan JNK, masing-masing.
- 25 Translokasi Selanjutnya, IL-1beta-dirangsang dari NF-kappaB ke dalam inti dan degradasi IkappaB-alpha diblokir oleh helenalin. Akhirnya, uji gen mengungkapkan bahwa MAPKs dan NF-kappaB diperlukan untuk IL-1beta-induced-9 MMP aktivitas luciferase dalam HTSMCs. MMP-9 aktivitas promotor
- 30 ditingkatkan oleh IL-1beta di HTSMCs transfected dengan MMP-9-Luc, yang dihambat oleh helenalin,, U0126 SB202190, dan SP600125. Diambil bersama-sama, faktor transkripsi NF-

kappaB, p42/p44 MAPK, p38 MAPK, dan JNK yang terlibat dalam MMP-9 ekspresi dalam HTSMCs terkena IL-1beta kini telah diidentifikasi.

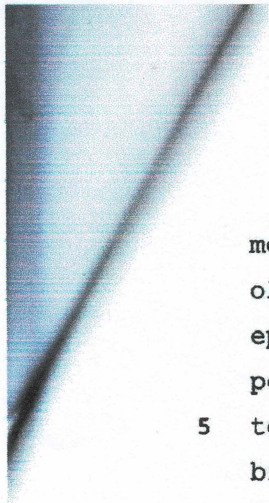
5 Invensi ini dapat menurunkan inflamasi epitel kornea yang ditandai dengan menurunnya ekspresi MMP 9. Penurunan MMP 9 ini menunjukkan berkurangnya degradasi matrix metalloproteinase dalam arti berkurangnya kerusakanyang terjadi pada permukaan bola mata penderita SMK.

10 Pemberian ekstrak jintan hitam (N. sativa) meningkatkan ekspresi EGFR epital kornea

Teori yang berkembang selama ini, bahwa pada kondisi menopause, baik secara alami ataupun operatif, akan terjadi penurunan regenerasi dan reepitelisasi yang ditandai dengan 15 penurunan EGF-EGFR. Ekspresi EGFR tampak menngkat setelah pemberian ekstrak jintan hitam (N. sativa).

Hasil analisa menunjukkan bahwa terdapat peningkatan bermakna dari invensi ini terhadap ekspresi MMP 9 epitel kornea. Pada analisa lanjutan didapatkan peningkatan 20 ekspresi MMP 9 yang menyerupai bahkan melebihi kondisi normal. Dosis jintan hitam (N. sativa) terkecil yang dapat menyebabkan peningkatan ekspresi EGFR epitel kornea adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin tinggi dosis ekstrak jintan hitam (N. sativa) yang diberikan maka peningkatan ekspresi EGFR 25 semakin bermakna.

Sinyal transduksi yang dimediasi oleh EGFR dapat melalui berbagai jalur untuk mencapai target *nuclear transcription factor* di sel. EGF yang berikatan dengan reseptornya (EGFR) akan mengalami dimerisasi, sehingga 30 terjadi aktivasi domain tyrosine kinase dan autofosforilasi reseptor. Phospholipase C (PLC, sebuah enzim membran)



me
o
ep
po
5
to
b.

Jalur aktivasi EGFR selain jalur tyrosine autophosphorylation diatas adalah dengan berikatan pada domain homolog Src protein *adapter*, selanjutnya akan terjadi aktivasi Ras, sebuah protein yang berikatan dengan GTP, diikuti dengan aktivasi jalur MAP kinase. Pada jalur ini, Raf merupakan titik kunci *cascade* MAPK. Raf merupakan bagian dari kontrol reseptor di nukleus yang muncul sebagai respon terhadap stress, pertumbuhan, diferensiasi, dan sitokin yang berhubungan dengan apoptosis. Anggota dari Raf yang memberikan respon terhadap perangsangan *growth factor* adalah *extracellular signal reponse kinases* 1 dan 2 (Erk-1 dan Erk-2). Raf juga mengacu pada aktivasi MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) atau MEKK yang akhirnya memfosforilasi MAPK. Terdapat dua bentuk isoform MAP kinase, yaitu p44 MAPK (Erk-1) dan p42 MAPK (Erk-2), yang diekspresikan pada sebagian besar sel. Substrat MAPK adalah *nuclear transcription factor* dan non nuklear seperti

protein, serine/threonine kinase p90sk, dan sitoskeletal. EGF yang menginduksi aktivasi transkripsi nuklear akan merangsang proliferasi sel dengan memulai progresivitas fase G ke fase S dalam siklus sel. Substrat yang
5 mengaktivasi MAPK lain adalah phospholipase A₂ (cPLA₂) yang akan mengkatalisasi pelepasan asam arachidonat dari fosfolipid dalam membran dan salah satu langkah dalam sintesa prostagandin dan eicosanoid lain.

Hasil uji pemberian invensi ini terhadap ekspresi
10 EGFR sebagai salah satu parameter faktor reepitelisasi telah sesuai dengan hipotesa penelitian. yaitu terdapat pengaruh yang signifikan antara pemberian ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) dengan peningkatan reepitelisasi epitel kornea yang ditandai dengan peningkatan ekspresi EGFR.
15 Peningkatan EGFR ini menunjukkan perbaikan reepitelisasi pada permukaan bola mata penderita SMK.

Pemberian ekstrak menurunkan jumlah PMN epital konjungtiva dan kornea

20 Sejalan dengan teori yang berkembang selama ini, bahwa pada kondisi menopause, baik secara alami ataupun operatif, akan terjadi migrasi sel-sel leukosit ke konjungtiva dan kornea yang ditandai dengan peningkatan PMN di konjungtiva dan kornea. Jumlah PMN tampak menurun
25 setelah pemberian ekstrak invensi ini.

Hasil analisa menunjukkan bahwa terdapat penurunan bermakna dari ekstrak invensi ini terhadap ekspresi PMN epitel konjungtiva dan kornea penderita menopause. Pada analisa lanjutan didapatkan penurunan ekspresi PMN yang
30 menyerupai kondisi normal. Dosis jintan hitam (*N. sativa*) terkecil yang dapat menyebabkan penurunan ekspresi PMN epitel konjungtiva dan kornea adalah 2,5 mg/kgBB. Semakin

tinggi dosis ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) yang diberikan maka penurunan ekspresi EGFR semakin bermakna.

Leukosit polimorfonuklear (PMN atau neutrofil) merupakan komponen penting dari sistem kekebalan tubuh bawaan manusia. Neutrofil beredar dengan cepat menuju daerah host dan / atau patogen yang diturunkan komponen, yang juga pertahanan pertama pada saat terjadi kondisi peradangan. PMN mengikat dan menelan mikroorganisme dengan proses dikenal sebagai fagositosis, yang biasanya memicu produksi oksigen reaktif dan fusi butiran sitoplasma bervakuola. Kombinasi neutrofil spesies oksigen reaktif dan komponen granul sangat efektif dalam membunuh sebagian besar bakteri dan jamur. Sejauh PMN adalah jenis yang paling melimpah di leukosit manusia dan mengandung gudang senyawa sitotoksik yang non-spesifik, neutrofil homeostasis harus diatur secara ketat. Untuk itu, PMN konstitutif diatur oleh apoptosis, suatu proses dimana sel-sel dihapus dengan aman oleh makrofag. Khususnya, apoptosis dipercepat menyusul fagositosis bakteri, sebuah proses yang muncul penting untuk resolusi inflamasi.

Hasil pengujian pemberian invensi ini terhadap ekspresi PMN sebagai salah satu parameter faktor inflamasi telah terbukti dapat menurunkan inflamasi epitel konjungtiva dan kornea yang ditandai dengan penurunan ekspresi PMN. Penurunan ekspresi PMN ini menunjukkan perbaikan kondisi inflamasi di permukaan bola mata penderita SMK.

Pada penelitian sebelumnya diberikan dosis ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) sebesar 2,5 - 5 mg/kg BB /hari untuk melihat dampak jintan hitam (*N. sativa*) terhadap perbaikan tikus model artirits reumatoid. Didapatkan

sediaan 1 mg/ml jintan hitam (*N. sativa*) untuk dosis 2,5, 5, dan 10 mg/kg BB/hari. Sehingga dengan berat tikus rata-rata 185 gram dibutuhkan :

Dosis 2.5 mg/kg BB/hari = $0,185 \times 2.5 = 0.4625$ mg/ hari =
5 0.46 cc/hari

Dosis 5 mg/kg BB/hari = $0,185 \times 5 = 0.925$ mg/ hari = 0.93
cc/hari

Dosis 10 mg/kg BB/hari = $0,185 \times 10 = 1.85$ mg/ hari = 1,85
cc/hari

10

Pengaruh ekstrak jintan hitam (*N. sativa*) pada hewan coba tikus yang diperoleh pada penelitian ini perlu dikaji pada manusia. Terdapat beberapa perbedaan yang mungkin menyebabkan terjadinya efek yang berbeda. Perbedaan pertama
15 adalah rute pemberian, dimana pemberian pada manusia adalah secara oral, sehingga konsentrasi plasma yang dicapai akan lebih rendah dibandingkan pemberian sub cutan, akibat adanya proses metabolisme dinding usus. Perbedaan kedua
20 adalah interval waktu antara terjadinya menopause dengan pemberian ekstrak jintan hitam (*N. sativa*). Semakin lama interval waktu antara terjadinya menopause dengan pemberian jintan hitam (*N. sativa*) maka efeknya bisa jadi akan semakin menurun akibat berkurangnya jumlah reseptor estrogen.

25

30

Klain

1. Proses pembuatan ekstrak etanol biji jintan hitam (*N. sativa*) yang terdiri dari :
 - melakukan maserasi menggunakan pelarut etanol dengan perbandingan 50 g bubuk jintan hitam dan 150 ml etanol 95% sampai terjadi homogenasi
 - menyimpan larutan dalam *refrigerator* bersuhu 40°C semalam,
 - memisahkan ekstrak dengan pelarutnya menggunakan *Rotary Evaporator* pada suhu 35°C hingga menjadi larutan pekat,
 - melarutkan hasil pengeringan sebanyak 1000 mg dengan 1 ml DMSO,
 - mengencerkan hingga 1 mg/ml.
2. Penggunaan ekstrak hasil proses dari klaim 1 dalam pembuatan obat untuk menurunkan faktor-faktor inflamasi IL-1, MMP-9, PMN dan meningkatkan EGFR pada konjungtiva dan kornea penderita menopause.
3. Penggunaan ekstrak hasil proses dari klaim 1, dengan dosis minimal 2,5 mg/kg BB per hari hingga 10 mg/kg BB/hari selama 10 hari hingga 1 bulan pada tikus model menopause.



Sindrom mata kering diklasifikasikan menjadi 2 kelompok, yaitu tipe defisiensi air mata, dimana terjadi defisiensi sekresi akuos, dan tipe evaporatif, yang disebabkan karena evaporasi air mata yang berlebihan. Tipe

5 defisiensi air mata dibagi lagi menjadi 2 kelompok, yaitu sjogren syndrome-associated keratoconjungttivitis sicca (SS KCS) yang berhubungan dengan penyakit autoimun dan non-sjogren keratoconjunngtivitis sicca (NS KCS) yang tidak berhubungan dengan penyakit autoimun. Tipe NS KCS merupakan

10 tipe terbanyak, meliputi 2/3 bentuk SMK. Masing-masing tipe SMK memiliki gambaran umum yang sama, yaitu adanya gejala yang khas, kerusakan permukaan bola mata, penurunan stabilitas air mata, dan hiperosmolaritas air mata. Meningkatnya evaporasi akibat gangguan pada lapisan lipid

15 merupakan penyebab terbanyak terjadinya hiperosmolaritas lapisan air mata. Hiperosmolaritas menyebabkan terjadinya stress proinflamasi pada permukaan bola mata (Nerayanan, 2006).

Berbagai agen sitokin proinflamasi pada SMK yang

20 disekresikan oleh makrofag akan menimbulkan destruksi sel konjungtiva dan kornea, salah satu sitokin penting yang diekspresikan adalah interleukin 1 (IL-1) (Foster, 2012). Perubahan lain yang terjadi adalah peningkatan konsentrasi matrix matalloproteinase 9 (MMP-9) yang disekresikan oleh

25 sel epitel kornea sebagai reaksi terhadap pelepasan sitokin. MMP-9 akan menimbulkan kerusakan membran basal epitel kornea dan protein tight junction yang mempertahankan fungsi barier epitel kornea (Wong, 2002). Inflamasi pada epitel kornea ini juga menimbulkan hilangnya

30 integritas epitel kornea yang membutuhkan proses epitelisasi dalam perbaikannya. Epidermal growth factor



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SERTIFIKAT PATEN

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan Paten kepada:

Nama dan Alamat
Pemegang Paten

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH MALANG
Jl Raya Tlogomas No. 246 Malang Jawa Timur,
INDONESIA

Untuk Inovasi dengan
Judul

: PROSES PEMBUATAN EKSTRAK JINTAN HITAM (*Nigella
sativa*) SEBAGAI PENGHAMBAT PROSES INFLAMASI
KONJUNTIVA DAN KORNEA INTERLEUKIN 1/IL1 DAN
MATRIX METALLOPROTEINASE 9/MMP-9, DAN
POLIMORFONUCLEAR/PMN) DAN PEMICU PROSES
EPITELISASI KORNEA (EPIDERMAL GROWTH FACTOR
RECEPTOR/EGFR)

Inventor

: dr Alfa Sylvestris, SpM

Tanggal Penerimaan

: 09 September 2013

Nomor Paten

: IDP000043949

Tanggal Pemberian

: 23 Desember 2016

Perlindungan Paten untuk inovasi tersebut diberikan untuk selama 20 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 22 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari inovasi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



00-2017-114103

a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
REPUBLIK INDONESIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

u.b.

Direktur Paten, Desain Tata Letak
Sirkuit Terpadu dan Rahasia Dagang,

Ir. Timbul Sinaga, M.Hum.
NIP. 196202021991031001

Malang, 30 MAY 2017

Keterangan :

Photocopy ini, sesuai dengan aslinya

Sebagaimana tersimpan di Sentra HKI UMM